



2023年2月13日

東北大学大学院薬学研究科

受容体のシグナル伝達機構の多様性に迫る

— シグナル伝達を緻密に制御した薬の開発に期待 —

【発表のポイント】

- 薬の主要な作用標的である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に関して、主要シグナル伝達の 1 つである Gi 経路を従来よりも詳細に解析する手法を開発しました。
- GPCR ごとに、Gi サブタイプの選り好みがあることを明らかにしました。
- 本研究は、副作用の少ない鎮痛薬などの薬剤の開発に貢献します。

【概要】

細胞は G タンパク質共役型受容体 (GPCR)^(注1) と呼ばれる細胞膜上に存在するセンサータンパク質群を利用して細胞外の情報を認識します。GPCR は、細胞外の情報伝達分子と結合すると、細胞内の三量体 G タンパク質^(注2) を介して細胞内に情報を伝達します。三量体 G タンパク質は伝達する情報の種類によって 4 つのファミリーに分類されます。このうち Gi ファミリーには 8 種類のメンバー (サブタイプ) が存在しますが、その使い分けは限られた GPCR のみでしか解析されていませんでした。

東北大学大学院薬学研究科の小野雄基博士課程大学院生・井上飛鳥教授らの研究グループは、遺伝子改変技術を用いて全ての Gi サブタイプを欠損した培養細胞株を樹立し、GPCR と個々の Gi サブタイプの相互作用を解析する手法を確立しました。これを用いて 11 種の GPCR について Gi サブタイプ選択性を解析したところ、これまで一括に Gai を活性化すると考えられていた複数の GPCR が、それぞれ異なる Gi サブタイプ選択性を有することを明らかにしました。本研究は、GPCR に作用する薬の作用機序の理解につながるとともに、副作用を低減させた薬の開発に繋がることが期待されます。

本研究成果は、2023年1月28日(現地時間)に Communications Biology 誌の電子版に掲載されました。

【詳細な説明】

研究背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) はヒトに約 800 種存在する膜型受容体タンパク質で、細胞外の情報を細胞内に伝達するセンサー分子として機能します。既存薬の約 3 割が GPCR を標的とすることから、GPCR は重要な創薬標的であると考えられます。

GPCR の細胞外部分にリガンド^(注3)が結合すると、GPCR は細胞内に存在する三量体 G タンパク質 (α , β , γ の 3 つのサブユニットから構成されます) を呼び寄せます。GPCR に結合した三量体 G タンパク質は活性型へと構造変化し、核酸交換反応を経て、 α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットに解離します。この一連の過程を G タンパク質の「活性化」と称します。乖離したサブユニットのうち、主に α サブユニットが細胞内の情報伝達経路をオンにする働きを有します。

ヒトには 16 種の α サブユニットが存在し、それらはアミノ酸配列相同性と情報伝達機構から 4 つ (Gs, Gi, Gq, G12) のファミリーに分類されます。Gi ファミリーは 4 つのファミリー中で最多の 8 種のサブタイプ (Gi1, Gi2, Gi3, Gt1, Gt2, Gt3, Go, Gz) から構成され、サイクリック AMP (cAMP)^(注4) の産生酵素であるアデニル酸シクラーゼ^(注5) を抑制するという共通した情報伝達機構を持ちます。一方で、個々のサブタイプが異なる特性を持つことが知られており、例えば、Go は活性のオンオフが素早く切り替わり、反対に Gz は一度活性化すると長期間活性化状態を維持します。したがってどの Gi サブタイプを活性化するかによって、質的に異なる情報伝達を行うと想定されますが、そのような選択性は限られた種類の GPCR に対してしか調べられていませんでした。

研究内容

個々の GPCR がどの Gi サブタイプを活性化するか解析するには、培養細胞での応答を調べる必要があります。しかしほとんどの培養細胞株には複数の Gi サブタイプが内在性に発現することから、単に特定の Gi サブタイプを外来性に発現させるだけではその活性化のみを評価することは困難でした。そこで、本研究では内在性に発現する全ての Gi サブタイプを欠損させた細胞 (Δ Gi 細胞) を作製しました。この細胞に特定の Gi サブタイプを外来性に発現させることで、その活性化を選択的に検出できます (図1)。

研究グループは、GPCR 研究で汎用される HEK293 細胞^(注7) をベースに、 Δ Gi 細胞の作製を行いました。HEK293 細胞に発現する 7 種の Gi サブタイプ (Gi1, Gi2, Gi3, Gt1, Gt2, Go, Gz) の遺伝子を CRISPR-Cas9 法^(注6) を用いてすべて欠損させました。実際に全ての Gi サブタイプが欠損していることを確認するため、代表的な Gi 共役型 GPCR であるミューオピオイド受容体を Δ Gi 細胞に発現させ、リガンドで刺激した際の cAMP 産生抑制作用を GloSensor cAMP アッセイ^(注8) で評価しました。その結果、Gi サブタイプを欠損させていない細胞ではリガンド刺激によって

cAMP 産生が抑制された一方で、 Δ Gi 細胞ではリガンド刺激を行っても cAMP 産生は抑制されませんでした。この結果から、 Δ Gi 細胞では全ての Gi サブタイプが欠損していることが機能的に確認されました。

上記の手法を拡張し、11 種の Gi 共役型 GPCR について、5 種類の Gi サブタイプ (Gi1, Gi2, Gi3, Go, Gz) を活性化するかそれぞれ評価しました。すなわち、GPCR と Gi サブタイプの 55 パターンの組み合わせについて、これらを発現させた Δ Gi 細胞を準備し、GloSensor cAMP アッセイで cAMP 産生抑制作用を計測しました。その結果、11 種の GPCR は、それぞれ異なる Gi サブタイプ選択性を示すことが分かりました (図2)。例えば、神経伝達物質ドパミンの受容体の 1 つである D2 受容体は Go を強く活性化した一方で、別のドパミン受容体である D4 受容体は Gz を強く活性化しました。D2 受容体は運動機能の制御に、D4 受容体は概日リズムの制御に関与することが知られています。前述の通り Go は活性化のオンオフが素早く切り替わる特性を持ち、Gz は持続的なシグナル伝達特性を持ちます。本研究の結果は、ドパミンが時間スケールの異なる生命現象を制御するための分子機構として、2 種類の Gi サブタイプ選択性が異なる受容体を使い分けていることを示しています (図3)。

今後の展望

近年バイアス型リガンドと呼ばれる特定の情報伝達経路のみを誘導するリガンドが、副作用リスクを低減させた薬の開発において着目されています。本研究では、GPCR ごとの Gi サブタイプ選択性を解析しましたが、同一の GPCR に対する複数のリガンドの Gi サブタイプ選択性を調べることは次の研究課題の1つです。例えば、ミューオピオイド受容体に作用する鎮痛薬は多数存在しますが、これらの Gi サブタイプ選択性を詳細に解析し、薬理作用と比較することで、鎮痛効果や副作用を発揮するメカニズムの理解に繋がります。この知見は、薬効が長期間持続する鎮痛薬の開発や副作用の少ない鎮痛薬の開発に繋がることが期待されます。また、本研究グループは先行研究において Gi 以外の Gタンパク質ファミリー (Gs, Gq, G12) を欠損させた細胞株も樹立しており、これらを利用することで複雑な GPCR の情報伝達機構の理解に繋がると考えられます。

説明図

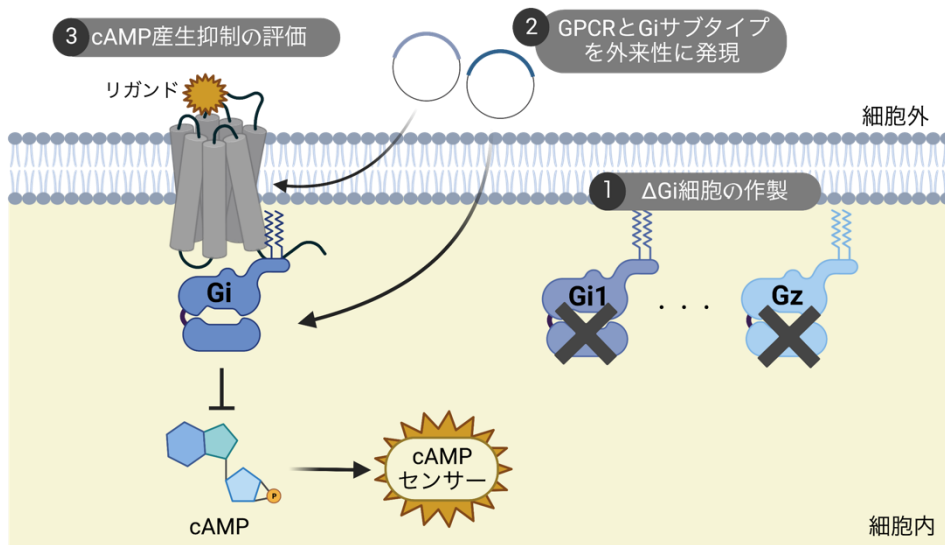


図 1 ΔGi 細胞を用いた GPCR の Gi サブタイプ選択性の解析方法

培養細胞に内在性に発現する Gi サブタイプの影響を失くすため、全ての Gi サブタイプを欠損させた細胞を作製した(①)。この細胞に評価対象の GPCR と Gi サブタイプのペア、および cAMP 依存性ルシフェラーゼ^(注9)を発現する DNA プラスミドベクター(図中の輪)^(注10)を遺伝子導入した(②)。次に、GPCR のリガンドを添加し、ルシフェラーゼによる発光変化を計測した(③)。Gi の活性化は cAMP の産生を抑制するため、ルシフェラーゼによる発光の減少が生じる。

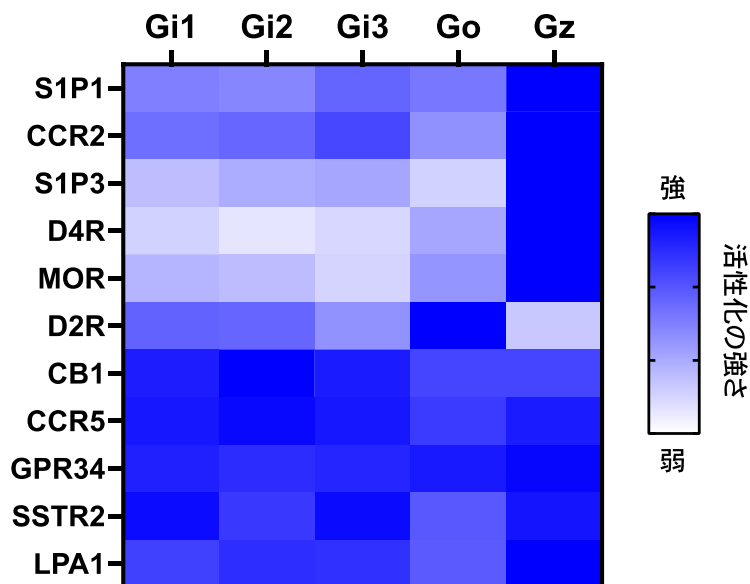


図 2 11 種の GPCR の Gi サブタイプ選択性

今回評価した 11 種の GPCR (行) による Gi サブタイプ (列) の活性化の強さをヒートマップにして表した。各ブロックの色が濃いほど該当する組み合わせが強く活性化することを表す。

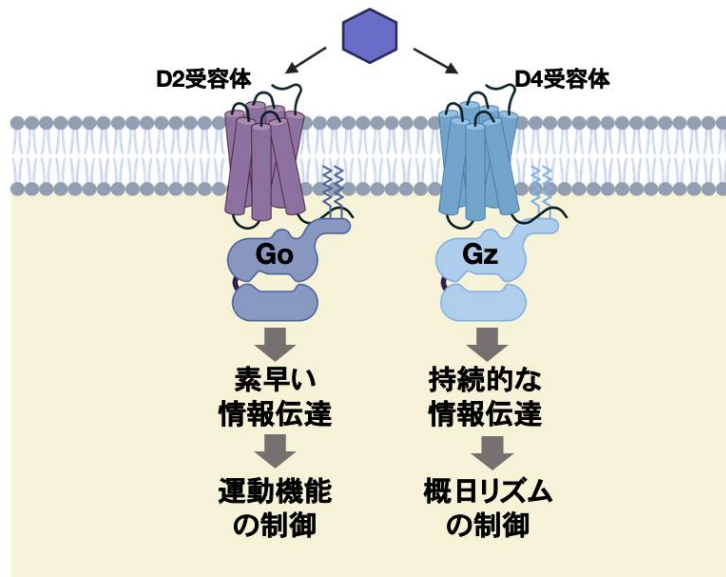


図3 2種類のドパミン受容体による Gi サブタイプの使い分け

本研究から、D2 受容体は Go を強く活性化し、D4 受容体は Gz を強く活性化することが分かった。この選択性の差異は、それぞれの生理機能を発揮するのに適していると考えられる。

【謝辞】

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業(20J20669, 21H04791, 21H05113, JPJSBP120213501, JPJSBP120218801)、科学技術振興機構創発的研究支援事業(JPMJFR215T)、ムーンショット型研究開発事業(JPMJMS2023)、日本医療研究開発機構創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(JP22ama121038)、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団を始め多数の研究費支援を受けて実施されました。

【用語説明】

(注 1) G タンパク質共役型受容体(GPCR)

7回細胞膜を貫通する構造を有する受容体タンパク質。細胞外の物質を認識すると活性型へ構造変化し、細胞内の情報伝達分子を活性化することで細胞外の情報を細胞内へ伝達する。

(注 2) 三量体 G タンパク質

α 、 β 、 γ の3つのサブユニットから構成される細胞内情報伝達タンパク質。リガンドと結合したGPCRと相互作用することで、 α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットに解離し、情報伝達活性がオンになる。主に α サブユニットが情報伝達経路を活性化する。

(注 3) リガンド

タンパク質に対して結合する分子。本研究内ではGPCRを活性化する分子を指す。

(注 4) サイクリック AMP (cAMP)

環状ヌクレオチドの一種で、細胞内情報伝達物質として働く。主にタンパク質リン酸化酵素を活性化することで機能する。

(注 5) アデニル酸シクラーゼ

サイクリック AMP を産生する膜貫通タンパク質。Gi との結合によってその活性が抑制される。

(注 6) CRISPR-Cas9

細菌の獲得免疫様機構を基に開発されたゲノム編集技術。編集したい標的ゲノム DNA 配列に相補的な配列を持つガイド RNA を用いることで、ゲノム上の任意の DNA 配列を改変することができる。本研究では、Gi サブタイプの遺伝子にフレームシフト変異を導入した。

(注 7) HEK293 細胞

ヒト胎児腎細胞由来の細胞株。外来性の遺伝子導入が容易であることから GPCR 研究を始め、さまざまな研究に汎用される。

(注 8) GloSensor cAMP アッセイ

cAMP が結合すると酵素活性を発揮する改変ルシフェラーゼを細胞に発現させることで、細胞内 cAMP 濃度を発光値として読み取る実験系。Gi の活性化を評価する場合はアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンと GPCR のリガンドを細胞に添加し、フォルスコリンによる cAMP 産生がどの程度抑制されるかを評価する。

(注 9) ルシフェラーゼ

発光物質が光を放つ化学反応を触媒する酵素。

(注 10) プラスミドベクター

外来性の遺伝子を細胞に発現させるために使用する環状 DNA。プラスミド DNA を遺伝子導入した細胞では、ここから mRNA が作られ、タンパク質が産生される。

【発表論文】

雑誌名: Communication Biology

論文タイトル: Generation of Gai knock-out HEK293 cells illuminates Gai-coupling diversity of GPCRs

(日本語訳: $G\alpha i$ 欠損細胞の作製によって GPCR-Gai サブユニットの共役多様性を解明する)

著者: 小野雄基、川上耕季、中村楽、石田覚、青木淳賢、井上飛鳥

DOI: 10.1038/s42003-023-04465-2

URL: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04465-2>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥

電話 022-795-6861

E-mail iaska@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科 総務係

電話 022-795-6801

Email ph-som@grp.tohoku.ac.jp